




**HUMAN H37 PROTEIN, AND cDNA CODING FOR THE SAME**

**Patent number:** JP2000135090  
**Publication date:** 2000-05-16  
**Inventor:** ARAI KENICHI; MASAI HISAO  
**Applicant:** JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP;; ARAI KENICHI;; MASAI HISAO  
**Classification:**  
**- international:** C12N15/09; A61K35/76; C07K14/47; C07K16/18; C12N5/10  
**- european:**  
**Application number:** JP19980311408 19981030  
**Priority number(s):**

**Also published as:**

 EP1125947 (A1)  
 WO0026250 (A1)  
 JP2000135090 (A)

**Abstract of JP2000135090**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new human H37 protein which has a specific amino acid sequence, is an activity-controlling subunit of protein Cdc7 which controls the replication of a cell, and can be used for controlling the cell growth, for inhibiting the growth of cancer cells, and so on.

**SOLUTION:** A new human H37 protein is provided which has the amino acid sequence shown in the formula, and is an activity-controlling subunit of protein Cdc7 which controls the replication of a human cell. A gene coding for the protein, an antibody against the protein, and so on, allow the growth control of human cells, and are hence useful for preparing a necessary amount, for example, of stem cells used for the treatment of various human diseases, the growth control of cancer cells, and so on. This protein is obtained by screening a human cDNA library prepared from a human cell using an oligonucleotide probe synthesized based on its partial base sequence, followed by incorporating the obtained gene into a vector to express the gene in a host cell.

```

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly
 1           5           10           15
Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu
          20           25           30
Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly
          35           40           45
          |
          |
          |
Ser Gly Ile Cys Asn Val Leu Asp Ile Tyr Gln Gln Glu Asn Ser Asp
          50           55           60           65
Asn Leu Leu Thr Ala Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr
          65           70           75
Gly Phe
          74
  
```

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-135090

(P2000-135090A)

(43) 公開日 平成12年5月16日 (2000.5.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5
16/18		16/18	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10		A 6 1 K 31/00	6 3 5 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 20 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-311408

(22) 出願日 平成10年10月30日 (1998. 10. 30)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 598150569

新井 賢一

東京都目黒区目黒1-9-6-206

(71) 出願人 598150570

正井 久雄

東京都港区三田5-7-8 シャンボール

三田620号

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードする

c D N A

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法の提供。

【解決手段】 特定の2種類の中のいずれかのアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質、上記のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子、このヒト遺伝子のcDNAであって、特定の2種類の中のいずれかの塩基配列を有するcDNA、これらcDNAの一部配列からなるDNA断片、上記cDNAを保有する組換えベクター、ヒトH37タンパク質に対する抗体、並びに上記DNAまたは抗体を細胞内に導入することによる細胞増殖制御方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項4】 配列番号2のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項5】 請求項1また2のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子。

【請求項6】 請求項5のヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3の塩基配列を有するcDNA、または配列番号3の塩基配列における1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するcDNA。

【請求項7】 請求項5のヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号4の塩基配列を有するcDNA、または配列番号4の塩基配列における1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するcDNA。

【請求項8】 請求項6のcDNAの一部配列からなるDNA断片。

【請求項9】 請求項7のcDNAの一部配列からなるDNA断片。

【請求項10】 請求項6のcDNAを保有する組み換えベクター。

【請求項11】 請求項7のcDNAを保有する組み換えベクター。

【請求項12】 請求項1または2のヒトH37タンパク質に対する抗体。

【請求項13】 請求項3または4のヒトH37タンパク質に対する抗体。

【請求項14】 請求項6のcDNAまたは請求項8のDNA断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖促進方法。

【請求項15】 請求項7のcDNAまたは請求項9のDNA断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖制御方法。

【請求項16】 請求項10の抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。

【請求項17】 請求項11の抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 この出願は、ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするcDNAに関するものである。さらに詳しくは、この出願は、ヒト細胞

の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学的材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 細胞の増殖は、増殖因子と呼ばれる液性因子が細胞表面の受容体に結合し、細胞内に増殖シグナルが伝達されることによって開始される。従って、培養細胞の増殖を人為的に誘導するためには、細胞増殖に増殖因子を過剰量添加したり、あるいはその細胞が本来は持っていない受容体を細胞表面に発現させ、その受容体に特異的な因子を培地に添加する方法等がとられてきた。また、細胞増殖を抑制するためには、受容体タンパク質に対する抗体や拮抗分子等を培地に添加し、受容体への増殖因子の結合を阻害する方法等が採用されてきた。

【0003】 一方、受容体への増殖因子の結合によって増殖シグナルが発せられた細胞は、そのゲノムDNAを複製し、娘細胞に均等に配分したのち分裂するというサイクルを繰り返す。このサイクルを、特に真核生物については「細胞周期」という。細胞周期は基本的に4期間に区分されている。すなわち、染色体DNAが複製するS期、複製した染色体が紡錘体によって分裂したのち細胞質が分裂するM期、M期が終わりS期が始まるまでのG1期、そしてS期が完了してM期が始まるまでのG2期である。特にG1期からS期への移行は厳密に制御されており、DNA複製はS期において1回だけ生じるようになっている。

【0004】 このような細胞周期は、酵母や高等真核細胞での研究からサイクリン依存性キナーゼがその進行に重要な役割を果たしていることが証明されている(Nature 292:558-560, 1981; Cell 66:731-742, 1991; Nature 349:338-393, 1991; Science 257:1958-1961, 1992; Bio essays 17:471, 1995)。また、酵母における遺伝学的解析からは、S期の開始時(G1-S移行)には別のセリン/スレオニンキナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。すなわち、細胞分裂周期変異株の一つとして単離されたcdc7変異(J. Mol. Biol. 59:183-194, 1971)において、Cdc7タンパク質キナーゼは染色体DNAの複製の開始直前に機能すること、そしてS期を通じて各複製起点の活性化に必要とされていることが明らかになってきた(Mol. Cell. Biol. 6:1590-1598, 1986; Genes Dev. 15:480-490, 1998; Genes Dev. 15:491-501, 1998)。また、Cdc7のキナーゼ活性は制御サブユニットであるDbf4の存在に依存することも明らかにされている(Genetics 131:21-29, 1992; Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993)。Dbf4の発現は周期的であって、転写レベルおよび翻訳後レベルの両

方で制御されており (Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)、G1-S境界期におけるCdc7キナーゼ活性の増加の少なくとも一部はDbf4の発現がG1後期に増加することによって説明されている (Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993; Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)。さらに、Dbf4は細胞内で複製起点と相互に作用する (Science 265:1243-1246, 1994) ことから、Cdc7は複製起点上に形成される複製装置を直接的に活性化することによりS期開始の引き金になっていると考えられている。

【0005】そしてさらに、この出願の発明者らは、これまでに酵母Cdc7に類似したキナーゼを分裂酵母、アフリカツメガエル、マウスおよびヒトから単離し、真核細胞の染色体複製は種差を超えて共通に保存されたこのキナーゼファミリーを含む機構によって制御されていることを指摘している (J. Biol. Chem. 273:23248-23257, 1998; EMBO J. 16:4340-4351, 1997; EMBO J. 14:3094-3104, 1995)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】以上のとおりの酵母および高等真核生物における知見から、細胞内のCdc7キナーゼ活性をコントロールすることによって、増殖因子/受容体結合の操作による従来方法とは全く別の手段による細胞増殖の人為的制御が可能になるものと期待される。

【0007】しかしながら、この出願の発明者らはまた、ヒトのCdc7ホモログの候補であるhuCdc7を動物細胞で増産させても、あるいは昆虫細胞で発現させてもそれ単独ではほとんどキナーゼ活性を示さないことを見出している。そこで、ヒトCdc7の制御サブユニットの存在を想定し、ヒトcDNAライブラリーを探索した結果、huCdc7に結合してそのキナーゼ活性を制御する新規なタンパク質をコードするcDNAを単離することに成功し、このcDNAにコードされたタンパク質をH37タンパク質と命名した。

【0008】この出願の発明は、発明者らによって取得されたこの新規タンパク質H37を産業上利用可能な形態として提供することを課題としている。またこの出願は、このタンパク質をコードするヒト遺伝子、この遺伝子のcDNAおよびタンパク質に対する抗体等の遺伝子操作材料を提供することを課題としている。

【0009】さらにこの出願は、これらの遺伝子操作材料を用いてヒト細胞の増殖を人的に制御する方法を提供することを課題としてもいる。

【0010】

【課題を解決するための手段】この出願は、上記の課題を解決する発明として、配列番号1または2のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質を提供する。また、この出願は、配列番号1または2のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは

は付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質を提供する。

【0011】さらに、この出願は、上記のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子、このヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3または4の塩基配列を有するcDNA、およびこれらcDNAの一部配列からなるDNA断片を提供する。さらにまたこの出願は、上記cDNAを保有する組換えベクター、およびヒトH37タンパク質に対する抗体を提供する。

10 【0012】そしてまたこの出願は、前記cDNAまたはその部分的あるいは一部を改変し変異を導入したDNA断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖促進方法、ならびに前記抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法を提供する。以下、この発明の実施の形態について詳しく説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】この発明のヒトH37タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有し、配列番号3に塩基配列を示したcDNAの518から2541番目までの配列領域にコードされているタンパク質分子である。この発明のH37タンパク質はまた、配列番号2のアミノ酸配列を有し、配列番号4のcDNAにおける518から1222番目までの配列領域にコードされているタンパク質である。配列番号3および4は同一のゲノム遺伝子から転写されたmRNAを鋳型とするcDNAであるが、配列番号4のcDNAは、配列番号3とは別のスプライシングフォームであり、配列番号3の1199-1259番目までが欠失している。

30 【0014】これらのH37タンパク質は公知の方法、すなわちヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、この発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいはこの発明によって提供されるcDNA断片を用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換えDNA技術によってH37タンパク質を取得する場合には、この発明のcDNA断片を有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換えてやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、cDNAがコードするH37タンパク質を大量に発現させることができる。

【0015】この発明のヒトH37タンパク質を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のcDNAの翻訳領域を挿入結合して組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体

を培養してやれば、cDNAがコードしているH37タンパク質を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。得られた融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって、cDNAがコードするタンパク質部分のみを取得することもできる。

【0016】この発明のヒトH37タンパク質を動物細胞で発現させる場合には、この発明のcDNAの翻訳領域を、動物細胞用プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入してやれば、この発明のH37タンパク質を動物細胞内で発現できる。以上のとおり

の方法によって得られるヒトH37タンパク質は、例えば、細胞内のhuCdc7のキナーゼ活性を阻害することによって細胞の増殖を抑制するための抗体作成のための抗原として使用することができる。

【0017】また、この発明のヒトH37タンパク質は、後記する実施例において実証されているように、構造上はこれまでに明らかにされているサイクリンとはほとんど類似性を持たないが、その発現が細胞周期によって制御されること、またhuCdc7触媒サブユニットに結合してそのキナーゼ活性を活性化するという点で、huCdc7キナーゼのサイクリン様構成因子とみなすことができる。従って、H37タンパク質は増殖因子によって誘導される細胞増殖のためのシグナル伝達経路において非常に重要な標的因子と考えられることから、H37タンパク質の発現あるいはその活性がG1-S期の細胞周期のシグナルによってどのように制御されているかを明らかにすることが、動物細胞における細胞複製の細胞周期制御の分子機構を明らかにする上で大きな新しい知見を提供するものと期待される。

【0018】この発明のヒトH37タンパク質には、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片(5アミノ酸残基以上)も含まれる。これらのペプチド断片もまた抗体を作製するための抗原として用いることができる。この発明の遺伝子は、上記ヒトH37タンパク質をコードするヒトの遺伝子であって、例えば、この発明のcDNAまたはその一部配列をプローブとして、既存のゲノムライブラリーから単離することができる。

【0019】この発明のcDNAは、配列番号3または4で表される塩基配列を有することを特徴とするものであり、例えばヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローン化することができる。cDNAはヒト細胞から抽出したポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。cDNAは、岡山-Berg法(Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2:161-170, 1982)、Gubler-Hoffman法(Gubler, U. and Hoffman, J. Gene, 25:263-269, 1983)、キャッピング法

【Kato, S. et al., Gene, 150:243-250, 1994)などの公知の方法を用いて作製することができる。

【0020】この発明のヒトH37タンパク質は脳および腎臓以外のいかなる組織でも発現しているので、配列番号3または4に記載のcDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明のcDNAと同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて、目的cDNAを合成することもできる。

【0021】一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号3または4において、1または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および/または他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAもこの発明に含まれる。同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および/または他のアミノ酸残基による置換がなされているタンパク質も、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を有する限り、この発明に含まれる。また、人為的に1または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および/または他のアミノ酸残基による置換を導入した変異タンパク質もこの発明に含まれる。

【0022】この発明のDNA断片には、配列番号3または4で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片(10bp以上)、あるいはそれらのアンチセンス鎖からなるDNA断片も含まれる。この発明のヒトH37タンパク質に対する抗体は、タンパク質それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

【0023】この発明の細胞増殖促進方法は、配列番号3または4の塩基配列を有するcDNA、もしくはそれらの一部配列からなるDNA断片(例えば後記実施例3に示したように、C端側の419個のアミノ酸配列領域をコードするDNA断片)とその発現制御配列(動物細胞用プロモーターおよび/またはエンハンサー配列)からなる組換えDNAを動物細胞に導入し、配列番号1または2のアミノ酸配列を有するH37タンパク質を細胞核内で過剰発現させることによって行うことができる。組換えDNAの細胞内への導入は公知の方法により行うことができる。例えばリン酸カルシウム法、リボソームや赤血球ゴーストを用いる方法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスやアデノウイルスをベクターとして用いる方法、ガラスビベットによる微量注入法等である。このような細胞増殖の促進は、例えば、ヒト疾患の治療に有用な幹細胞を大量に取得するために有用である。すなわち、血液幹細胞や神経幹細胞など、他種類の

細胞に分化する幹細胞は、ヒトの身体を構成する多くのタンパク質を作り出すことができるため、白血病等の疾患において幹細胞の移植は極めて重要な治療手段である。しかしながら、幹細胞を分化させることなしに自己増殖させる液性因子は同定されていないため、治療に必要な量の幹細胞を調製することは容易ではなかった。この発明の方法は、幹細胞内の増殖プログラムを操作することによって試験管内で無制限に細胞を自己複製、自己増殖させることを可能にする。また、このような試験管内での細胞増殖促進は、ex vivo 方式による遺伝子治療のための遺伝子導入用細胞を大量に調製するためにも有用である。

【0024】この発明の細胞増殖抑制方法は、前記の抗体を細胞内に注入することによって行うことができる。あるいは、細胞内在性のH37タンパク質遺伝子の発現を阻害することによっても行うことができる。例えば、遺伝子の転写産物に対するアンチセンス配列またはリボザイム配列をコードするDNAを細胞内に導入する方法等である。このような細胞増殖の抑制は、例えば癌細胞の過剰増殖を抑制するための新たな手段を提供するものと期待される。

【0025】

【実施例】次に実施例を示しこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1：HeLa細胞のcDNAライブラリーをpGAD-GHベクターを用いて作成し、huCdc7がGal4のDNA結合ドメインに融合された組換えプラスミドを保有する酵母CG1945株に各ベクターを導入した。約 $3 \times 10^5$ 個の形質転換酵母をスクリーニングした結果、ベータガラクトシダーゼが陽性のクローンを5個得た。インサートのDNA塩基配列を決定し、データベースを検索した結果、これらは全て新しいcDNAであった。そのうち3クローンは同一のものであり、配列番号1の塩基配列を有していた。このcDNAをH37と命名した。他の2つは単独のクローンであり、それぞれH1およびH18と命名した。

【0026】これらの陽性クローンによるコードされるタンパク質とhuCdc7との相互作用を動物細胞における増産系を用いてさらに検討した。すなわち、mycエピトープで標識したH1、H18およびH37のそれぞれの発現プラスミドを全長huCdc7発現プラスミドとともに動物細胞Cos7にトランスフェクションした。結果は図1に示したとおりである。huCdc7に対する抗体による免疫沈降によってH37タンパク質は共沈殿されたが、H1およびH18タンパク質は共沈殿されなかった(図1：上段レーン2-4)。逆に、myc抗体を用いた免疫沈降により、huCdc7はmyc標識のH37を共発現している細胞においてのみ共沈殿された(図1：下段レーン4)。この結果から、H37cDNAのみがhuCdc7と

効率よく相互作用するタンパク質をコードしていることが確認された。

【0027】次いで、内在性のH37タンパク質について調べるために、H37のN端およびC端領域に対する抗体(抗H37N抗体、抗H37C抗体)をそれぞれ作成した。さらに、H37のC端オリゴペプチドに対する抗体(抗H37Cpep抗体)およびhuCdc7のC端オリゴペプチドに対する抗体(抗huCdc7Cpep抗体)も作成した。そして、各抗体と細胞内における内在性huCdc7およびH37との会合を測定した。結果は図2に示したとおりである。すなわち、H37に対する抗体はいずれもCos細胞で発現した90kDaのmyc標識H37タンパク質と特異的に反応した(図2：レーン1-4)。アフィニティ精製した抗ペプチド抗体を用いてヒトCEM細胞から調製した複合体を共沈殿することができた。huCdc7およびH37免疫沈殿物中にいずれもhuCdc7が含まれていることが抗huCdc7Cpep抗体を用いた免疫ブロットにより確認された(図2：レーン5および7)。このH37とhuCdc7との相互作用は、抗体作成の抗原として用いたペプチドと抗体とを予めpre-incubationすることによって完全に消失した(図2：レーン8)。HeLa細胞の抽出液においては、Cdc7抗体およびH37抗体はいずれも、H37抗体と特異的に反応する80kDaの1本のポリペプチドを共沈殿することができた(図2：レーン9-13)。

【0028】以上の結果から、内在性のhuCdc7とH37タンパク質が複合体として細胞内に存在していることが判明した。

実施例2

H37タンパク質がhuCdc7を活性化する能力があるか否かを調べるために、myc標識したH37と野生型あるいはキナーゼ失活型のhuCdc7をCos細胞で発現させて得たhuCdc7/H37キナーゼ複合体を、huCdc7抗体またはmyc抗体で免疫沈殿し、続いてGST-MCM3融合タンパク質を基質として用いて、invitroのキナーゼ反応を測定した。結果は図3および図4に示したとおりである。野生型のhuCdc7の存在下では、huCdc7抗体の免疫沈降物およびmyc抗体の免疫沈降物の両方においてMCM3タンパク質の効率のよいリン酸化観察された(図3：レーン2および7)。さらに、もう2本のリン酸化タンパク質が観察され、それらはトランスフェクションされたhuCdc7およびmycH37であると同定された(データ示さず)。これらのリン酸化はキナーゼ失活型のhuCdc7では全く検出されないことから、huCdc7のキナーゼ活性がこれらのリン酸化に作用していることが確認された。ただし、キナーゼ失活型のhuCdc7もH37タンパク質と複合体を形成することができる(図3：レーン3および8、図4：レーン2および4)。さらにタンパクゲル電気泳動上でのH37タンパク質の移動度は野生型huCdc7が共発現されている場合は遅くな

り、複数のバンドとして検出されたが、この移動度の変化はキナーゼ失活型huCdc7では観察されなかった(図4:レーン1および3)。移動度が遅くなっているバンドは脱リン酸化酵素処理により消失することから、それらは過リン酸化されたH37タンパク質であることが確認された(データ示さず)。また、昆虫細胞においてhuCdc7とH37タンパク質を共発現することにより、MCM2およびMCM3タンパク質を効率よくリン酸化することのできる極めて強いキナーゼ活性を再構成することができた(データ示さず)。

【0029】以上の結果は、H37タンパク質がhuCdc7キナーゼを活性化し、さらにH37タンパク質自身がhuCdc7によりリン酸化されることを示している。また、これらの実験条件下では、huCdc7触媒サブユニットのみが発現された場合には、内在性のH37タンパク質のレベルが低すぎるためにキナーゼ活性は僅かであった(図3:レーン4および9)。これらの事実から、H37タンパク質がhuCdc7の制御細胞ユニットをコードし、そのキナーゼ活性を特異的に活性化していることが確認された。

#### 実施例3

H37タンパク質のアミノ酸配列(配列番号1)を検討した。その結果、図5および図6に示したように、出芽酵母Dbf4と33%の相同性を有するアミノ酸配列領域が見出された。この保存ドメイン(H37モチーフC)は、ラット、ショウジョウバエおよび分裂酵母で同定されたH37類似遺伝子にも存在する(図6)。また、H37のもう一つのアミノ酸領域(H37モチーフN)はラットおよびショウジョウバエのH37類似遺伝子に保存されていた。ただし、このH37モチーフNは出芽酵母のDbf4タンパク質には保存されていなかった(図6)。

【0030】次に、huCdc7との結合に必須なH37タンパク質上の領域を決定するために、図7に示したような一連のH37N端およびC端欠失変異を作成し、各々をGal4活性化ドメインとの融合タンパク質として酵母内で発現させて、それぞれの欠失変異体とhuCdc7との相互作用をtwo-hybridアッセイで検討した。結果は図8に示したとおりである。N端の欠失の結果、N端255アミノ酸を削除してもhuCdc7との相互作用には影響を与えなかった( $\Delta N2$ )。しかしながら、さらにN端50アミノ酸を削除してH37モチーフCを欠失させるとhuCdc7との相互作用は完全に失われた( $\Delta N3$ )。

【0031】一方、C端からの欠失においては、20アミノ酸を削除しただけでhuCdc7との結合能力が約60%まで低下した( $\Delta C$ )。さらに、243あるいは369アミノ酸をC端から欠失させると( $\Delta P2$ および $\Delta B$ )、相互作用は全長クローンの約10%までに低下した。N端の235アミノ酸のみを含む $\Delta P1$ はhuCdc7と相互作用しなかった。ただし、 $\Delta B$ と $\Delta N2$ に共通に存在する

50アミノ酸はhuCdc7との効率のよい相互作用のためには充分ではなかった(データ示さず)。

【0032】以上に述べたH37欠失誘導体の一部をhuCdc7とともにCOS7細胞内に共発現し、huCdc7タンパク質と複合体を形成するかを抗体共沈法により確認した。その結果、two-hybrid assayの結果と同様に、全長H37タンパク質の他に、 $\Delta\text{deltaB}$ 、 $\Delta\text{deltaN2}$ のH37欠失誘導体のみがhuCdc7と複合体を形成することが明らかにされた(図9)。

10 【0033】以上の結果は、H37モチーフCがH37タンパク質とhuCdc7触媒サブユニットとの相互作用に必須であること、しかしそのみでは充分ではないことを示している。出芽酵母においては、H37モチーフCを含む領域がCdc7との結合に充分であるということが既に報告されている(Mol. Cell. Biol. 15:6775-6782, 1996)。さらに、これらの欠失変異を用いてin vitroキナーゼ反応を行った結果、Dbf4モチーフCを含むC端の419アミノ酸のみでリン酸化活性で充分であることが判明した(データ示さず)。

#### 20 実施例4

種々のヒト組織および癌細胞におけるH37 mRNAの発現パターンをノーザンブロットにより検討した。結果は図10a、bに示したとおりである。H37 cDNA特異的プローブにより、脳と腎臓以外の全ての組織において、また全ての癌細胞において、2.5 kbの転写産物が検出された。このことは、huCdc7のmRNAは脳と腎臓においても比較的高い発現が観察されること(EMBO J. 16:4340-4351, 1997)とは対照的であった。検査した組織の中では、H37 mRNAの発現が最も高かったのは睾丸、次いで胸腺であり、この両組織はhuCdc7触媒サブユニットの発現が特に高い組織でもあることが発明者等によって報告されている(EMBO J. 16:4340-4351, 1997)。また、睾丸においては6 kbと4 kbの2本の別のRNAバンドも検出された(図10a)が、これらの転写産物の正体は不明である。さらに、H37 mRNAは、肺癌細胞A549を除いたほとんど全ての癌細胞において極めて高いレベルで発現していることが確認された(図10b)。このことは、活発な増殖能を有する細胞でもH37タンパク質の重要な役割を示している。

#### 40 実施例5

H37の発現が細胞周期によって制御されているかどうかを検討するため、ヒト正常線維芽細胞WI38細胞を血清飢餓によりG0期に同調させ(図11)、トータルRNAを血清添加後の種々の時間に調整し、ノーザンブロットでH37 mRNAのレベルを検討した。結果は図12に示したとおりである。H37 mRNAレベルは、休止期の細胞では低く、細胞がG1-S境界に近づくに従って徐々に増加していき、血清添加後20時間で最大に達した。この図12に示した発現パターンは、増殖刺激によって誘導されることが知られているhuCdc6の転写



産物の発現パターン (Mol. Cell. Biol. 15:4215-4224, 1995; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:142-147, 1997) に似ている。

【0034】さらに、H37の細胞周期内で発現変動を調べるために、エルトリエーション法によりヒトCEM細胞を各細胞周期に分画し(図13)、ノーザンブロットを行った(図14)。その結果、H37 mRNAはG1期には低く、G1後期からS期にかけて上昇し、S期の間は高く維持され、G2期にやや減少するがまだ高く維持されていることが示された。また、ノコダゾールによりHeLa細胞をG2後期に停止させ、同調的に細胞周期を移行させた実験(図15)においてもH37 mRNAはG2からG1への移行に従って減少し、S期への移行の際に再び上昇することが示された(図16)。Cdc6の発現も同様にG1からS期への移行に伴って上昇するが、S期が進行するにつれて減少し、G2期には低く抑えられる点がH37とは異なる。この結果は、H37 mRNAの発現は進行する細胞周期のなかでも変動し、それが機能すると考えられるS期に最大になることを示す。

【0035】H37の発現をさらに調べるために動物細胞内におけるH37タンパク質の細胞内局在を測定した。2種類のH37特異的抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った結果、HeLa細胞とW138細胞の両方において、内在性H37タンパク質は核内に非常に明確な数々のスポットとして観察された(図17)。これらの結果および発明者らがすでに報告しているhuCdc7触媒サブユニットの核内局在(EMBO J. 16:4340-4351, 1997)とあわせて、huCdc7/H37複合体は核に局在するキナーゼであり、その制御細胞ユニットは細胞周期のシグナルに依存して発現していることが確認された。

#### 実施例6

細胞周期のG1-S移行における内在性H37タンパク質の機能を抗体微量注入法により検討した。H37タンパク質のN端305アミノ酸に対する抗体(抗H37N抗体)およびC端のオリゴペプチドに対する抗体(抗H37Cpep抗体)をアフィニティ精製し、これらの抗体をヒト唇由来の正常線維芽細胞(KD細胞)に微量注入した。KD細胞は予め血清飢餓によってG0期に停止させておき、血清再添加によって同調的に細胞周期へと移行させたものを使用した。ヌクレオチド誘導体であっ

＊て、細胞内に取り込まれるBrdU陽性の細胞数を測定することにより、どれくらいの画分の細胞が決定添加後の種々の時期にS期に存在するかを調べた。結果は図18に示したとおりである。細胞は血清添加後約18時間でDNA合成を始め、24時間後にはほぼ90%の細胞がS期に入っていることを確認した。

【0036】従って、この実施例では、細胞がまだG1後期の状態である血清添加後12時間の時点で抗体を微注入し、ほぼ完全にS期に入ったと考えられる26時間後の時点で細胞を固定してBrdU陽性細胞を計測した。結果は図19に示したとおりである。抗H37N抗体を微注入した細胞の70%がS期に移行することができなかったのに対し、コントロール抗体による影響はほとんど見られなかった。また、抗H37Cpep抗体の微注入によっても抗H37N抗体と同等あるいはそれ以上のS期移行阻害効果が観察された。しかも、抗H37Cpep抗体作成のための抗原であるペプチドと抗H37Cpep抗体とを同時に細胞内に微注入した場合には、70%以上の細胞がS期に移行することができた。

【0037】図20は、BrdUと微注入抗体の染色例である。抗体は細胞がG1中期から後期にある段階で微注入されており、この時期にはH37タンパク質の発現は低いと考えられる。微注入された抗体は、新しく合成されたH37タンパク質に効率よく結合し、その結果、H37タンパク質の核内への移行を阻害すると考えられる。これらの結果は、H37の機能、すなわちhuCdc7/H37複合体の機能が動物細胞のS期進行に要求されることを強く示唆する。

#### 【0038】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法が提供される。これによって、各種のヒト疾患の治療に用いられる幹細胞等の必要量を調整することが可能となり、あるいは癌細胞の増殖抑制のための新規な手段を開発することが可能となる。

#### 【0039】

#### 【配列表】

<10> 出願人氏名：科学技術振興事業団

<20> 発明の名称：ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするcDNA

<60> 配列の総数：4

<10> 配列番号：1

<11> 配列の長さ：674

<12> 配列の型：PRT

<13> ホモサビエンス

<400> 配列



13

14

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu  
 20 25 30  
 Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly  
 35 40 45  
 Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu  
 50 55 60  
 Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr  
 100 105 110  
 Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe  
 115 120 125  
 Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu  
 130 135 140  
 Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser  
 180 185 190  
 Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln  
 195 200 205  
 Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp  
 210 215 220  
 Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro  
 225 230 235 240  
 Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp  
 245 250 255  
 Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln  
 260 265 270  
 Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu  
 290 295 300  
 Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe  
 325 330 335  
 Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys Arg Ile Lys  
 340 345 350  
 Tyr Ser Val Gly Ser Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys  
 355 360 365  
 Thr Glu Gln Lys Glu Lys Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp  
 370 375 380  
 Cys Gln Glu Asp Asp Thr Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys  
 385 390 395 400

15

16

Glu Thr Gln Glu Thr Glu Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile  
 405 410 415  
 Pro His Pro Ser Asn Glu Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn  
 420 425 430  
 Lys Cys Ser Met Leu Ser Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe  
 435 440 445  
 Thr Gln Leu Pro Leu His Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile  
 450 455 460  
 Ser Glu His Thr Leu Ser Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp  
 465 470 475 480  
 His Tyr Lys Cys Asn Ile Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser  
 485 490 495  
 Thr Asp Asn Ser Gly Ser Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu  
 500 505 510  
 Phe Pro Ala Lys Asp Leu Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr  
 515 520 525  
 His Asp Ser Gly Leu Ile Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr  
 530 535 540  
 Val Gln Ala Lys Ala Pro Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu  
 545 550 555 560  
 Cys Asp Phe Lys Asn Met Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg  
 565 570 575  
 Lys Val Lys Ile Ile Leu Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro  
 580 585 590  
 Asn Ala Glu Phe Asp Lys Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn  
 595 600 605  
 Arg Ile Cys Ser Ser Pro Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr  
 610 615 620  
 Ser Glu Glu Lys Ser Glu Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys  
 625 630 635 640  
 Ser Gly Ile Cys Asn Val Leu Asp Ile Trp Glu Glu Glu Asn Ser Asp  
 645 650 655  
 Asn Leu Leu Thr Ala Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr  
 660 665 670  
 Gly Phe  
 674

&lt;210&gt; 配列番号: 2

&lt;211&gt; 配列の長さ: 234

&lt;212&gt; 配列の型: PRT

&lt;213&gt; ホモサピエンス

&lt;400&gt; 配列

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu  
 20 25 30  
 Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly  
 35 40 45  
 Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu  
 50 55 60  
 Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser

17 18  
 65 70 75 80  
 Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr  
 100 105 110  
 Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe  
 115 120 125  
 Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu  
 130 135 140  
 Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser  
 180 185 190  
 Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln  
 195 200 205  
 Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp  
 210 215 220  
 Met Ser Gln Ser Pro Ala Val His Leu Met  
 225 230 234

&lt;210&gt; 配列番号: 3

&lt;211&gt; 配列の長さ: 2780

&lt;212&gt; 配列の型: DNA

&lt;213&gt; ホモサピエンス

&lt;400&gt; 配列

AATTCGGCAC GAGCTCTCTG AGGCTCGGCC AAGACCTGAA GCGGCGGACC GAGAGCCCGG 60  
 GTCTGAGACT GAGAGAGCAA CGGAATGAG GCGGGTAGA GCGGAAACA CAACCTGCAG 120  
 GCGCAGAGCG AGGCCGAGAG AGGACGGCGG CGTGAGGGGG GCGGGCCCGC AGCGCGAGAA 180  
 GCGAGGCACG AGGGCGGAGC GCGAGCGCGG GCACGGCCCG TGCGTGAGA GCGGGCGGGG 240  
 GCGCGTATC GCGCGCGCGG CCGCGTGACG CGTTTTCAA TCTTCAACCG CCGCAGCCCA 300  
 CTGCTTTGTG CTTTCCGCGT TCCTCTCCG CGCCTTGAG CCGGATCCCG CCGCGGAAAC 360  
 CCGACCTGCA GACGCGGTAC CTCTACTCG TAGAGGCGT AGCTGGCGGA AGGAGAGAGG 420  
 GCGCCGTCCT GTCAACAGGC GCGGGGAAGC CGTGCTTTGG CCGCTGCCCG GTGCGACACT 480  
 TTCTCCGAC CCAGCATGTA GGTCCCGGCC GACTGCCATG AACTCCGAG CCATGAGGAT 540  
 CCACAGTAAA GGACATTTCC AGGGTGAAT CCAAGTCAA AATGAAAAA ACAGACCATC 600  
 TCTGAAATCT CTGAAAAC TGATAACAGGC AGAAAAATCC AAATGTAAGC CACTTTGGGG 660  
 AAAAGTATT TACCTTGACT TACCTTCTGT CACCATATCT GAAAACTTC AAAAGGACAT 720  
 TAAGGATCTG GGAGCGCGAG TTGAAGAATT TCTCAGCAA GATATCAGTT ATCTTATTTT 780  
 AAATAAGAAG GAAGCTAAAT TTGCACAAAC CTTGGGTGGA ATTTCTCCTG TACCAAGTCC 840  
 AGAATCTGCA TATACTGCAG AAACCACTTC ACCTCATGCC AGCCATGATG GAAGTTCATT 900  
 TAAGTACCA GACACAGTGT GTTAAAGCAG AGGAAAATTA TTAGTTGAAA AAGCTATCAA 960  
 GGACCATGAT TTTATTCCTT CAAATAGTAT ATTATCAAT GCCTTGTCAT GCGGAGTAAA 1020  
 AATTCTTCAT ATTGATGACA TTAGATACTA CATTGAACAA AAGAAAAAAG AGTTGTATTT 1080  
 ACTCAAGAAA TCAAGTACTT CAGTAAGAGA TGGCGGCAAA AGAGTTGGTA GTGGTGCACA 1140  
 AAAACAAGA ACAGGAAGAC TCAAAAAGCC TTTTGTAAAG GTGGAAGATA TGAGCCAACT 1200  
 TTATAGGCCA TTTTATCTTC AGCTGACCAA TATGCCITTT ATAAATTATT CTATTCAGAA 1260  
 GCGCTGCAGT CCATTTGATG TAGACAAGCC ATCTAGTATG CAAAAGCAA CTCAGGTAA 1320  
 ACTAAGAATC CAACAGATG CGGATAAGTA TGGTGAAGCC TCAATTCAAC TCCAGTTGAA 1380  
 AGAGAAGAAG AAAAAAGGAT ATTGTGAATG TTGCTTGACG AAATATGAAG ATCTAGAAAC 1440

19

20

TCACCTTCTA AGTGAGCAAC ACAGAACTT TGCACAGAGT AACCAGTATC AAGTTGTTGA 1500  
 TGATATTGTA TCTAAGTTAG TTTTGTACTT TGTGGAATAT GAAAAGGACA CACCTAAAAA 1560  
 GAAAAGAATA AAATACAGTG TTGGATCCCT TTCTCCTGTT TCTGCAAGTG TCCTGAAAAA 1620  
 GACTGAACAA AAGGAAAAAG TGAATTGCA ACATATTTCT CAGAAAGATT GCCAGGAAGA 1680  
 TGATACAACA GTGAAGGAGC AGAATTCCT GTATAAGAG ACCCAGGAAA CTGAAAAAAA 1740  
 GCTCCTGTTT ATTTGAGAGC CCATCCCCCA CCCTTCAAAT GAATTGAGAG GGCTTAATGA 1800  
 GAAAATGAGT AATAAATGTT CCATGTTAAG TACAGCTGAA GATGACATAA GACAGAATTT 1860  
 TACACAGCTA CCTCTACATA AAAACAAACA GGAATGCATT CTGACATTT CCGAACACAC 1920  
 ATTAAGTGAA AATGACTTAG AAGAACTAAG GGTAGATCAC TATAAATGTA ACATACAGGC 1980  
 ATCTGTACAT GTTCTGATT TCAGTACAGA TAATAGTGA TCTCAACCA AACAGAAGTC 2040  
 AGATACTGTG CTTTTCCAG CAAAGGATCT CAAGGAAAAG GACCTTCATT CAATATTTAC 2100  
 TCATGATTCT GGTCTGATAA CAATAACAG TTCACAAGAG CACCTAAGT TTCAGGCAAA 2160  
 GGCTCCATTC CATACTCTC CTGAGGAACC CAATGAATGT GACTTCAAGA ATATGGATAG 2220  
 TTTACCTTCT GGTAAATAC ATCGAAAAGT GAAAATAATA TTAGGACGAA ATAGAAAAGA 2280  
 AAATCTGAA CCAATGCTG AATTGATAA AAGAACTGAA TTTATTACAC AAGAAGAAAA 2340  
 CAGAATTTGT AGTTCACCG TACAGTCTT ACTAGACTTG TTTGAGACTA GTGAAGAGAA 2400  
 ATCAGAATTT TTGGGTTTCA CAACTACAC AGAAAAGAGT GGTATATGCA ATGTTTTAGA 2460  
 TATTTGGAA GAGGAAAATT CAGATAATCT GTTAACAACG TTTTCTCGT CCCCTTCAAC 2520  
 TTCTACATT ACTGCTTTT AGAATTTAA AAATGCATAC TTTTCAAG TGATAAGGAT 2580  
 CATATCTTG AAATTTTAT AAATATGTAT GGAATTCCT AGGATTTTTT TACCAGCTTT 2640  
 GTTACAGAC CCAATGTAA ATATTAATAA TAAATATTG CAATTTTCTA CAGAATTGAA 2700  
 TACCTGTTAA AGAAAAATTA CAGAATAAAC TTGTGACTGG TCTGTTTTA CATTAAAAAA 2760  
 AAAAAAAA AAACTCGAG 2780

&lt;210&gt; 配列番号: 4

&lt;211&gt; 配列の長さ: 2719

&lt;212&gt; 配列の型: DNA

&lt;213&gt; ホモサピエンス

&lt;400&gt; 配列

AATTCGGCAC GAGCTCTCTG AGGCTGGCC AAGACCTGAA GCGGCGGACC GAGAGCCCGG 60  
 GTCTGAGACT GAGAGAGCAA CGGAATGGAG GCGGGTAGA GCGGAAACA CAACCTGCAG 120  
 GGCAGAGCG AGGCCGAGA AGGACGGCG CGTGAGGGG GCGGCGCGC AGCGCGAGAA 180  
 GGCAGGACG AGGGCGGAG GCGAGCGCG GCACGGCGG TGCGTGAGA GCGGCGCGG 240  
 GCGCGTATC GCGGCGCGG CCGGTGAGG CGTTTTCAA TCTTCAACCG CCGCAGCCCA 300  
 CTGTTTGTG CTTTGGCCT TCCTCTCGG CGCCTTGGG CCGGATCCG CCCCGAAAC 360  
 CCGACCTGCA GACGGGTAC CTCTACTGG TAGAGGCGT AGCTGCCGA AGGAGAGAG 420  
 GCGCGTCTT GTCAACAGG CCGGGGAAAC CGTGCTTTC GCGTGGCCG GTGCGACAT 480  
 TTCTCCGAC CCAGCATGTA GGTCCCGGC GACTGCCATG AACTCCGAG CCATGAGGAT 540  
 CCACAGTAAA GGACATTTCC AGGTGGAAT CCAAGTCAA AATGAAAAA ACAGACCATC 600  
 TCTGAAATCT CTGAAACTG ATAACAGGC AGAAAAATCC AAATGTAAGC CACTTTGGG 660  
 AAAAGTATT TACCTTGACT TACCTTCTG CACCATATCT GAAAACTTC AAAAGGACAT 720  
 TAAGATCTG GGAGCGGAG TTGAAGAATT TCTCAGCAA GATATCAGT ATCTTATTT 780  
 AAATAAGAAG GAAGCTAAT TTGCACAAAC CTTGGGTGA ATTTCTCTG TACCAAGTCC 840  
 AGAATCTGA TATACTGAG AAACCACTTC ACCTCATCC AGCATGATG GAAGTTCATT 900  
 TAAGTACCA GACACAGTG GTTTAAGCAG AGGAAATTA TTAGTTGAAA AAGCTATCAA 960  
 GGACCATGAT TTTATTCCTT CAATAGTAT ATTATCAAT GCCTTGTCAT GGGAGTAAA 1020  
 AATTCTTCAT ATTGATGACA TTAGATACTA CATTGAACAA AAGAAAAAG AGTTGTATTT 1080  
 ACTCAAGAAA TCAAGTACTT CAGTAAGAGA TGGGGGCAA AGAGTTGTA GTGGTGACA 1140  
 AAAACAAGA ACAGGAAGAC TCAAAAAGC TTTTGTAAG GTGGAAGATA TGAGCCAAAG 1200  
 CCCTGCAGT CATTGTATGT AGACAAGCA TCTAGTATG AAAAGCAAC TCAGTTAAA 1260  
 CTAAGATCC AACAGATGG CGATAAGTAT GGTGGAACCT CAATTCAACT CCAGTTGAAA 1320

21

GAGAAGAAGA AAAAAGGATA TTGTGAATGT TGCTTGACAG AATATGAAGA TCTAGAAACT 1380  
 CACCTTCTAA GTGAGCAACA CAGAACTTT GCACAGAGTA ACCAGTATCA AGTTGTTGAT 1440  
 GATATTGTAT CTAAGTTAGT TTTTGACTTT GTGGAATATG AAAAGGACAC ACCTAAAAAG 1500  
 AAAAGAATAA AATACAGTGT TGGATCCCTT TCTCCTGTTT CTGCAAGTGT CCTGAAAAAG 1560  
 ACTGAACAAA AGGAAAAAGT GGAATTGCAA CATATTTCTC AGAAAGATTG CCAGGAAGAT 1620  
 GATACAACAG TGAAGGAGCA GAATTTCTCT TATAAAGAGA CCCAGGAAAC TGAAAAAAAG 1680  
 CTCTGTTTA TTTCAGAGCC CATCCCCCACC CCTTCAAATG AATTGAGAGG CCTTAATGAG 1740  
 AAAATGAGTA ATAAATGTTT CATGTTAAGT ACAGCTGAAG ATGACATAAG ACAGAATTTT 1800  
 ACACAGCTAC CTCTACATAA AAACAACAG GAATGCATTC TTGACATTTC CGAACACACA 1860  
 TTAAGTGAAA ATGACTTAGA AGAACTAAGG GTAGATCACT ATAAATGTAA CATACAGGCA 1920  
 TCTGTACATG TTTCTGATTT CAGTACAGAT AATAGTGGAT CTCACCAAAA ACAGAAGTCA 1980  
 GATACTGTCC TTTTCCAGC AAAGGATCTC AAGGAAAAAG ACCTTCATTC AATATTTACT 2040  
 CATGATTCTG GTCTGATAAC AATAAACAGT TCACAAGACC ACCTAACTGT TCAGGCAAAG 2100  
 CCTCCATTCC ATACTCTCTC TGAGGAACCC AATGAATGTG ACTTCAAGAA TATGGATAGT 2160  
 TTACCTTCTG GTAAATACA TCGAAAAGTG AAAATAATAT TAGGACGAAA TAGAAAAGAA 2220  
 AATCTGGAAC CAAATGCTGA ATTTGATAAA AGAACTGAAT TTATTACACA AGAAGAAAAC 2280  
 AGAATTTGTA GTTACCCCGT ACAGTCTTTA CTAGACTTGT TTCAGACTAG TGAAGAGAAA 2340  
 TCAGAATTTT TGGGTTTCAC AAGCTACACA GAAAAGAGTG GTATATGCAA TGTTTTAGAT 2400  
 ATTTGGGAAG AGGAAAATTC AGATAATCTG TTAACAGCGT TTTTCTCGTC CCCTTCAACT 2460  
 TCTACATTTA CTGGCTTTTA GAATTTAAAA AATGCATCT TTTCAGAAGT GATAAGGATC 2520  
 ATATTCITGA AATTTTATA AATATGTATG GAAATTCCTA GGATTTTTTT ACCAGCTTTG 2580  
 TTTACAGACC CAAATGTAAT TATTAAAAAT AAATATTTGC AATTTTCTAC AGAATTGAAT 2640  
 ACCTGTAAAA GAAAAATTAC AGAATAAACT TGTGACTGGT CTGTTTTTAC ATTAAAAAAA 2700  
 AAAAAAAAAA AAACCTGAG 2719

## 【図面の簡単な説明】

【図1】動物細胞で発現させたhuCdc7とH37の共免疫沈降を測定したウェスタンブロッティングの結果である。レーン1-4：免疫沈降物、レーン5-7：細胞総抽出液、上段および中段：huCdc7抗体No.1により免疫沈降したもの、下段：myc抗体により免疫沈降したもの。抽出液は、huCdc7とH1（レーン2、5）、H18（レーン3、6）H37（レーン4、7）またはhuCdc7のみ（レーン1）をトランスフェクションしたCos7細胞から作成した。ウェスタンブロッティングは、抗myc抗体（上段）または抗huCdc7抗体No.1（中段および下段）を用いて行った。

【図2】H37タンパク質に対する抗体と細胞内における内在性huCdc7とH37との会合を測定したウェスタンブロッティングの結果である。myc標識したH37をトランスフェクションしたCos7から作成した核抽出液を、抗H37C抗体（レーン1）、抗H37N抗体（レーン2）、抗H37C-pep抗体（レーン3）あるいは抗myc抗体（レーン4）によりプロットした。矢印は、mycタグに加えて5'非コード領域に由来する63アミノ酸を含んでいるH37タンパク質の位置を示している。CEM細胞から作成した抽出液を抗huCdc7C-pep抗体（レーン5、6）、あるいは抗H37C-pep抗体（レーン7、8）により免疫沈降し、タンパクゲル電気泳動したのち、huCdc7モノクローナル抗体（4A8）を用いてプロットした。－と＋は、免疫沈降の際にそれぞれの

抗原が存在するか否かを示している。レーン9-13はHeLa細胞の核抽出液のウェスタンブロッティングであり、抗huCdc7抗体No.1（レーン9）、抗huCdc7モノクローナル抗体4A8（レーン10）、抗H37C抗体（レーン11）、抗H37N抗体（レーン12）、抗H37C-pep抗体（レーン13）を用いている。

【図3】抗huCdc7抗体No.1（レーン1-5）または抗myc抗体（レーン6-10）を用いてmyc標識H37のみ（レーン1、6）、myc標識H37と野生型huCdc7（レーン2、7）、myc標識H37とキナーゼ失活型huCdc7（レーン3、8）をトランスフェクションしたCos7細胞の抽出液から免疫沈降を行った結果を示す。コントロールとして野生型huCdc7のみ（レーン4、9）およびキナーゼ失活型huCdc7（レーン5、10）も同様に測定した。

【図4】野生型huCdc7の共発現により誘導されるH37の電気泳動上での移動度の変化である。野生型またはキナーゼ失活型のhuCdc7をmyc標識H37とともに発現しているCos7細胞から抽出液を作製し、抗huCdc7抗体No.1（レーン1、2）または抗myc抗体（レーン3、4）で免疫沈降し、抗myc抗体（上段）または抗huCdc7抗体（下段）でプロットした。試料は8%SDS-PAGEタンパクゲルに流した。

【図5】配列番号1と同一の全長H37タンパク質のアミノ酸配列である。

【図6】Dbf4とH37の構造を比較した模式図と2つ

の保存領域のアミノ酸配列の比較である。Dbf4上の両向きの矢印で示された領域は、Cdc7との相互作用に充分であると報告されている領域である。H37上の両向き矢印で示された領域は、それぞれhuCdc7との相互作用に必須である（しかし充分ではない）領域と、huCdc7キナーゼ活性の促進に充分な領域を示す。

【図7】H37タンパク質のN端およびC端欠失変異の模式図である。それぞれのバー端部の数字は欠失の端のアミノ酸番号（配列番号1に対応）を示す。斜線領域はDbf4モチーフCを示す。

【図8】H37欠失変異体のhuCdc7とのtwo-hybridアッセイにおけるlacZ活性を示す。

【図9】H37欠失変異体の一部をhuCdc7とともにCOS7細胞内に共発現し、huCdc7タンパク質と複合体を形成するかを抗体共沈法により検討した結果を示す。

【図10】aは種々の臓器でのH37 mRNA発現のサザン解析の結果であり、bは種々の癌細胞でのH37 mRNA発現のノザン解析の結果である。

【図11】休止期にあるWI38細胞を10%血清添加により増殖刺激し、様々な時間経過においてそのDNA含量をFACSで解析した結果を示す。

【図12】図11に示した細胞からRNAを抽出し、H37およびhuCdc6の発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれのmRNAの相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図13】エルトリエーション法によるヒトCEM細胞の各細胞周期分画を示したグラフ図である。

\* 【図14】図13に示した各分画のH37およびCyclin Eの発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれのmRNAの相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図15】ノコダゾールによりHeLa細胞をG2後期に停止させ、同調的に細胞周期を移行させた場合のDNA含量をFACSで解析した結果を示す。

【図16】図15に示した各細胞周期におけるH37およびCyclin Eの発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれのmRNAの相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

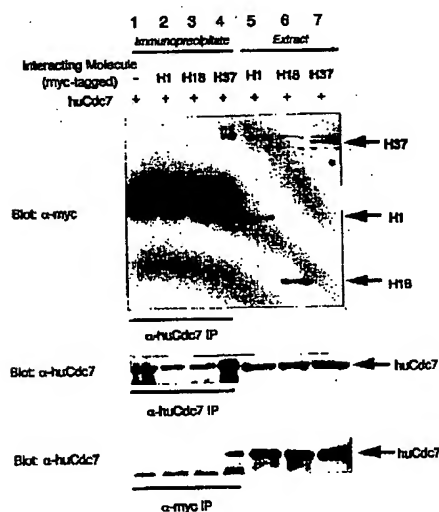
【図17】間接蛍光抗体法によるH37の細胞局在の解析結果を示す。使用した抗体は、抗H37C抗体（A）、抗H37N抗体（C）、コントロール抗体（E）、B、D、FはDAPI染色像である。

【図18】血清刺激後のKD細胞におけるDNA合成の誘導の時間的変化をBrdU取り込み量を指標として調べた結果を示す。

【図19】血清飢餓により同調したKD細胞に、血清添加後12時間の時点で各抗体を微注入し、さらに16時間後にBrdU取り込み量を測定して計測したDNA合成を行っている細胞の割合を示す。

【図20】抗H37C-pep抗体（左側）または抗H37C-pepとペプチドの混合物を微注入された細胞を例示した顕微鏡写真である。取り込まれたBrdU（上段）、注入された抗体（中段）、細胞（下段）を示す。

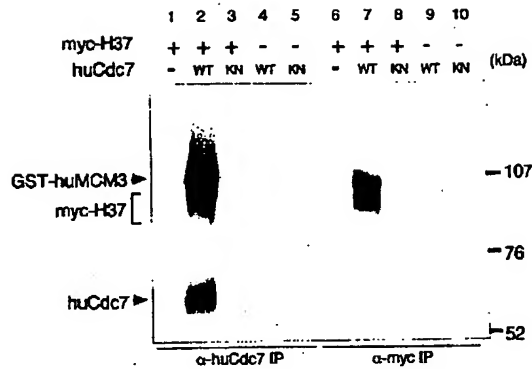
【図1】



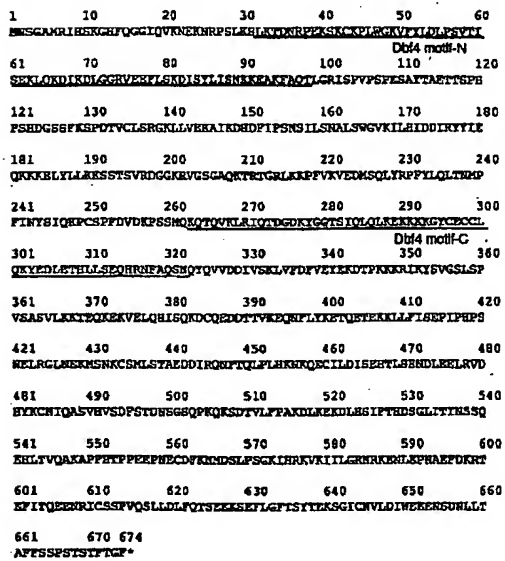
【図2】



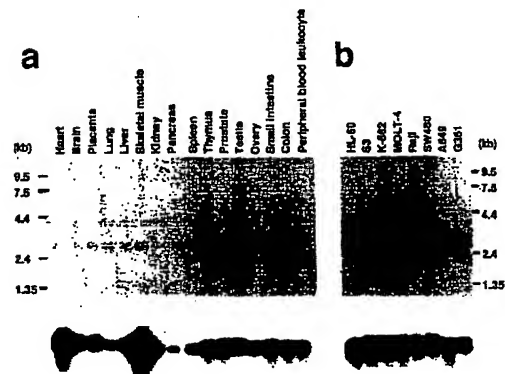
【図3】



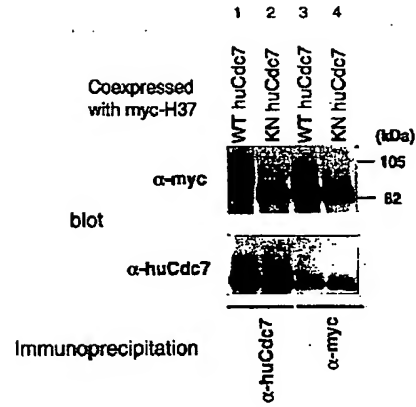
【図5】



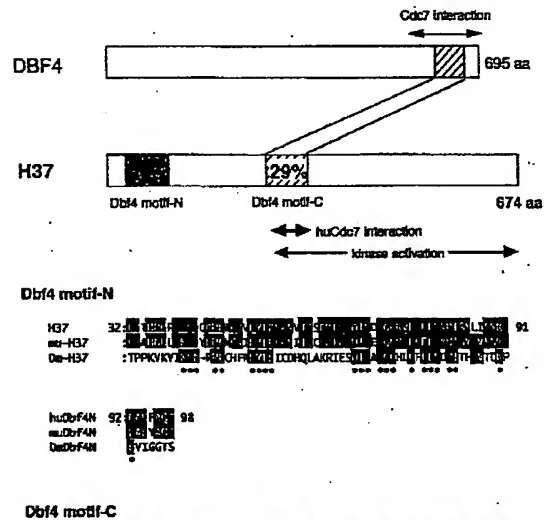
【図10】



【図4】



【図6】



Dbf4 motif-N

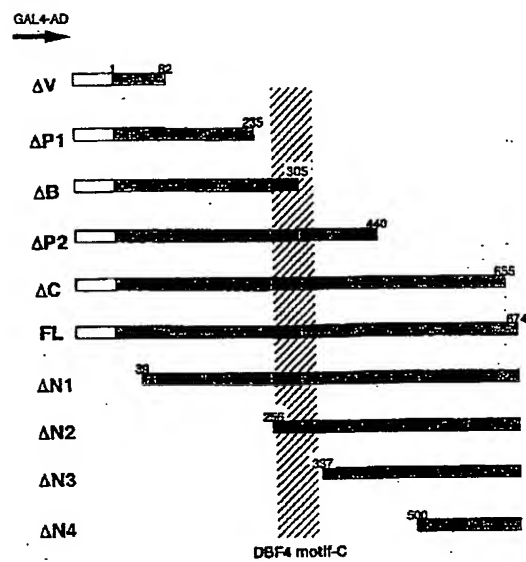
H37 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

Dbf4 motif-C

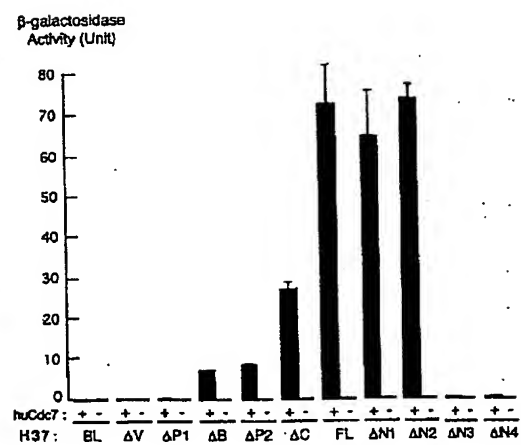
H37 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000



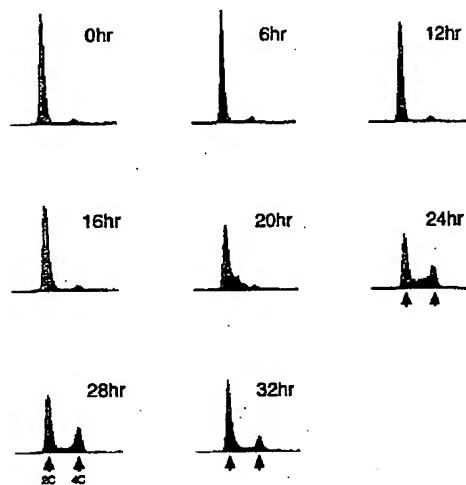
【図7】



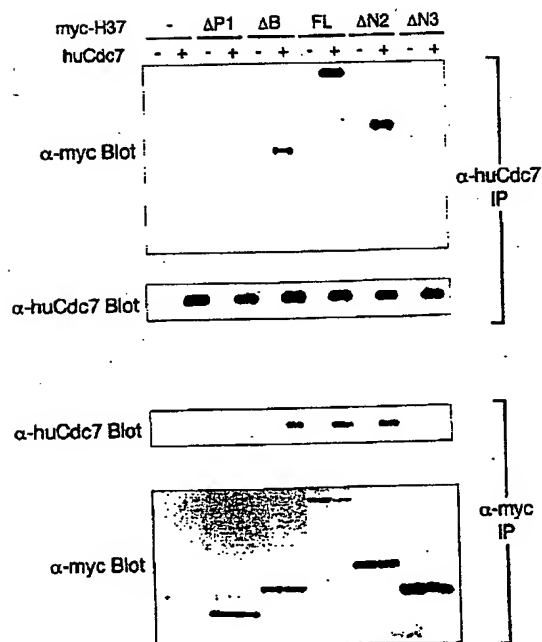
【図8】



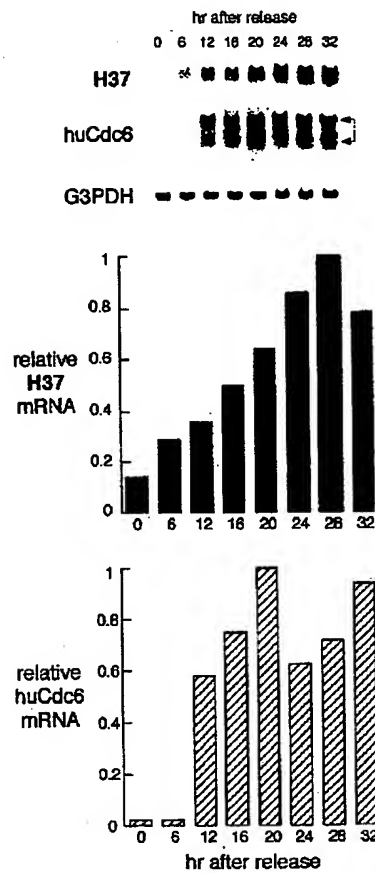
【図11】



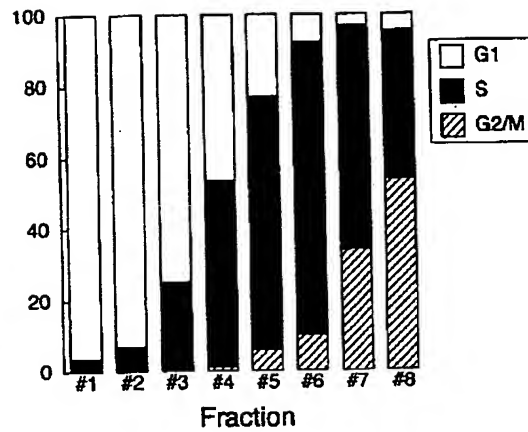
【図9】



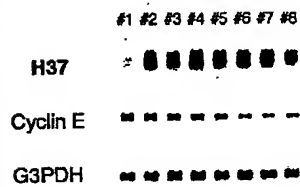
【図12】



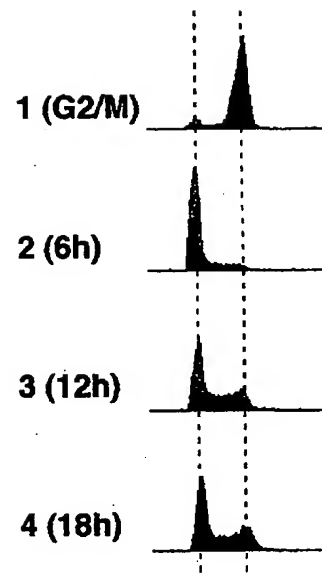
【図13】



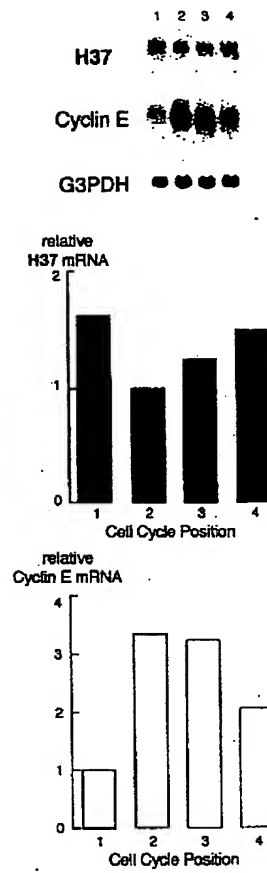
【図14】



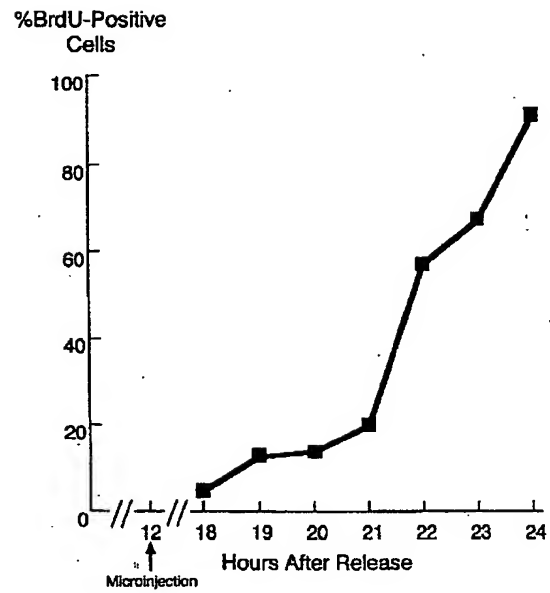
【図15】



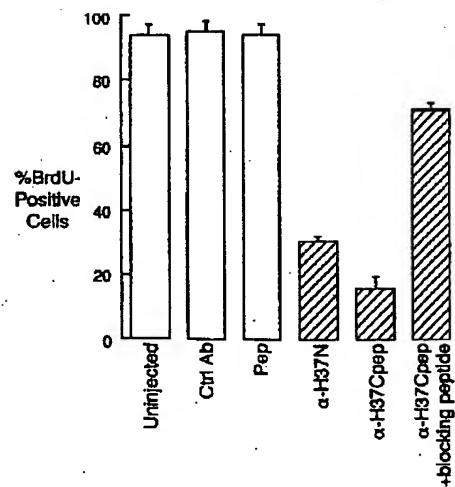
【図16】



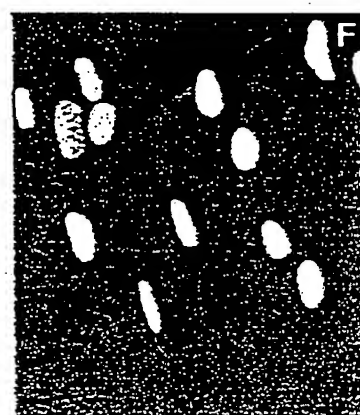
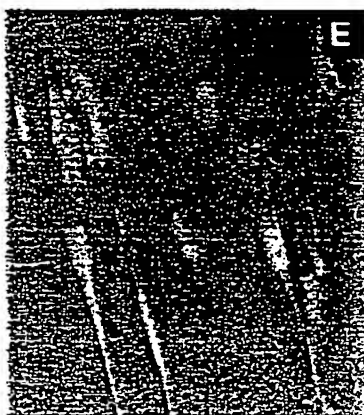
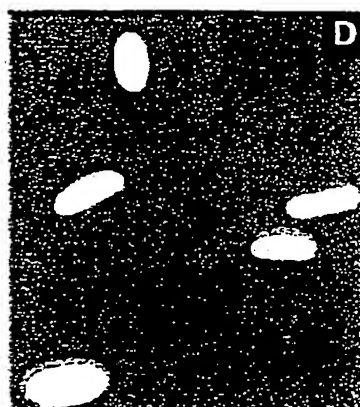
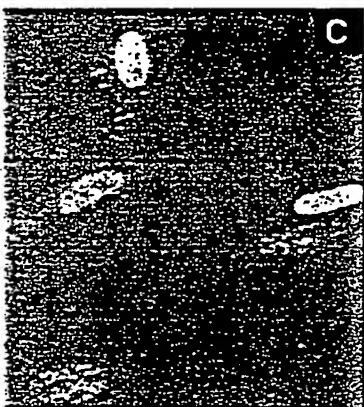
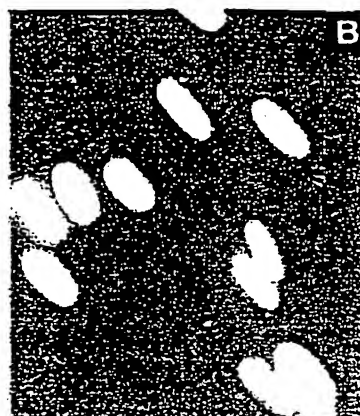
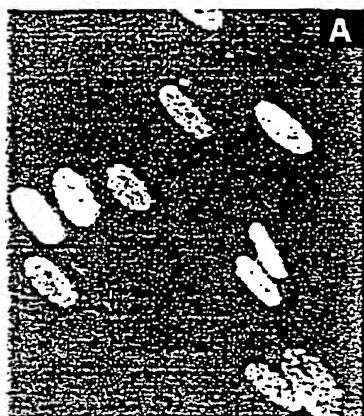
【図18】



【図19】

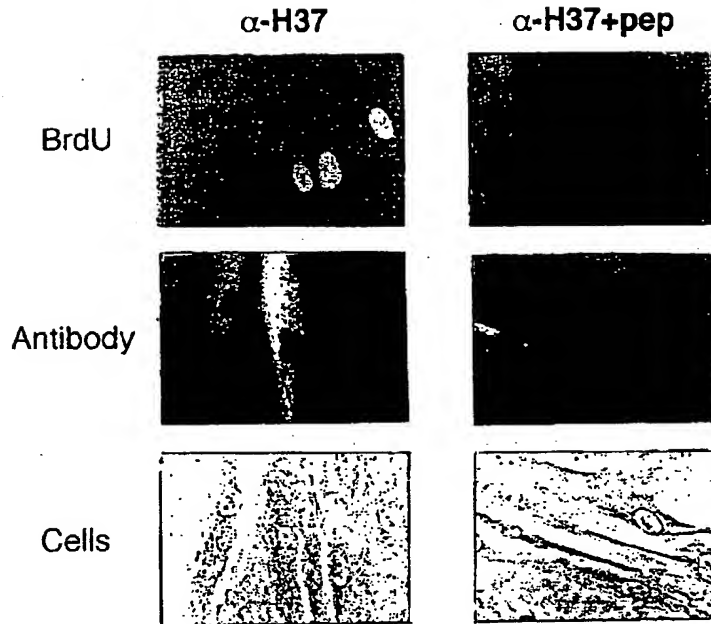


【図17】



【図20】

Microinjection with



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
// A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 31/00	6 4 3 B 4 C 0 8 7
43/00		39/395	E 4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395		48/00	
48/00		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			

(72)発明者 新井 賢一  
東京都目黒区目黒1-9-6-206

(72)発明者 正井 久雄  
東京都港区三田5-7-8 シャンボール  
三田620号

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA41 BA61 BA80  
CA04 CA06 CA07 DA02 EA04  
FA01 FA10 GA11 HA01  
4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19  
CC24 DA01 DA20  
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14  
BA02 CA24 CA25 CA44  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08  
BA22 CA25 CA53 DA39 NA14  
ZB262 ZC802  
4C085 AA13 AA14 AA17 AA18 BB11  
DD62  
4C087 AA01 AA02 AA10 BB33 BB65  
BC83 CA12 CA16 CA44 ZB26  
ZC80  
4H045 AA10 AA11 BA10 CA41 DA75  
DA76 DA86 EA28 FA72 FA74  
HA05

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**